



1 SEP 2003

SELESAI

LAPORAN PENELITIAN
PENELITI MUDA

PAMERAN

**PENGARUH BEBERAPA MACAM ELISITOR TERHADAP
PEMBENTUKAN ALKALOID VINKRISTINA
PADA KULTUR KALUS *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**

MILIK
PEPUSATAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Peneliti :

**Y. Sri Wulan Manuhara
Mulyadi Tanjung
Edy Setiti Wida Utami**

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 314/XXIII/3/--/1998 Tanggal 31 Maret 1998
Kontrak Nomor : 068/P2 IPT/DPPM/LITMUD/V/1998
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud
Nomor Urut : 06

FAKULTAS MATEMATIKA & ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Januari, 1999

3000 061023141

IR - Pepustakaan Universitas Airlangga



1. ALKALOIDS - PHYSIOLOGICAL EFFECT

IR - Perpustakaan Universitas Airlangga

2. MEDICINAL PLANTS



LAPORAN PENELITIAN
PENELITI MUDA

SELESAI

KKC

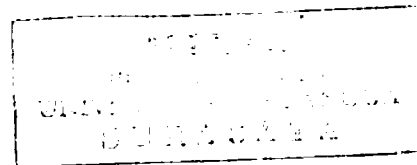
KK

581.634

Man

p-1

**PENGARUH BEBERAPA MACAM ELISITOR TERHADAP
PEMBENTUKAN ALKALOID VINKRISTINA
PADA KULTUR KALUS *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**



Peneliti :

**Y. Sri Wulan Manuhara
Mulyadi Tanjung
Edy Setiti Wida Utami**

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**Dibiayai Oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 314/XXIII/3/--/1998 Tanggal 31 Maret 1998
Kontrak Nomor : 068/P2 IPT/DPPM/LITMUD/V/1998
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud
Nomor Urut : 06**

**FAKULTAS MATEMATIKA & ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Januari, 1999**

3000 06100 3141

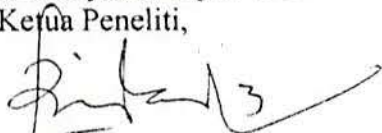
**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA**

1. a. Judul Penelitian : Pengaruh Beberapa Macam Elisitor Terhadap Pembentukan Alkaloid Vinkristina Pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don
- b. Macam Penelitian : () Dasar () Terapan
() Pengembangan
- c. Kategori : I / II / III
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap dan Gelar : Dra. Y. Sri Wulan Manuhara, MSi.
- b. Jenis Kelamin : L / P
- c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata /IIIc/131801396
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Muda
- e. Fakultas/Jurusan : FMIPA UNAIR/Biologi
- f. Univ./Akademi/Sekolah Tinggi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu yang diteliti : Kultur Jaringan tanaman
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Laboratorium Biologi Reproduksi
5. Bila penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan.
- a. Nama Instansi : -
- b. Alamat : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 bulan
7. Biaya yang diperlukan : Rp. 4.500.000,-
(Empat juta lima ratus ribu rupiah)

Mengetahui,
Dekan Fakultas MIPA


Drs. Harjana, MSc.
NIP. 130 355 371

Surabaya, 21 April 1999
Ketua Peneliti,


Dra. Y. Sri Wulan M., MSi
NIP. 131 801 396

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian


Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP. 130 355 372



Scan Ekha 2001 - 057 - 2001 - LIIPA

Laporan Penelitian

Pengaruh Beberapa Macam Elisitor Terhadap Pembentukan Alkaloid Vinkristina Pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* G. Don

Y. Sri Wulan Manuhara



LAPORAN PENELITIAN

**PENGARUH BEBERAPA MACAM ELISITOR TERHADAP
PEMBENTUKAN ALKALOID VINKRISTINA
PADA KULTUR KALUS *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**

Oleh :

Dra. Y. Sri Wulan Manuhara,MSi.

Drs. Mulyadi Tanjung, MS

Dra. Edy Setiti Wida Utami, MS.

**DIBIYAI PROYEK PENGKAJIAN DAN PENELITIAN ILMU PENGETAHUAN TERAPAN
DENGAN SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN PENELITIAN NOMOR :**

536/J03.12/PL/1998

**DIREKTORAT PEMBINAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN PADA MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDRAL PENDIDIKAN TINGGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN**

**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga
Maret, 1999**

RINGKASAN

PENGARUH BEBERAPA MACAM ELISITOR TERHADAP PEMBENTUKAN ALKALOID VINKRISTINA PADA KULTUR KALUS *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Y. Sri Wulan Manuhara, Mulyadi Tandjung, Edy Setiti Wida Utami, 1999, 41 halaman)

Catharanthus roseus (L.)G. Don mengandung bermacam-macam alkaloid indol yang berguna sebagai anti tumor. Di antara 90 jenis alkaloid yang terdapat pada *C. roseus* terdapat lebih kurang 20 macam alkaloid indol yang dapat mematikan kanker terutama pada leukemia dan limphoma malignant, yaitu vinblastina dan vinkristina. Beberapa faktor lingkungan, seperti adanya interaksi sel tanaman dengan organisme lain (bakteri, jamur, serangga dan lain-lain) dapat mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder. Organisme yang dapat merangsang terbentuknya metabolit sekunder tersebut disebut elisitor.

Mikroorganisme manakah yang berperan sebagai elisitor biologis dalam pembentukan alkaloid vinkristina pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.)G. Don ?

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh beberapa macam elisitor terhadap pembentukan alkaloid vinkristina pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Penelitian terdiri dari dua tahap, yaitu (1) kultur kalus dengan perlakuan, dan (2) ekstraksi dan isolasi alkaloid. Kultur kalus mula-mula ditumbuhkan pada media MS ditambah 2,4-D dan BAP masing-masing 1 mg/l. Setelah 4 minggu disubkultur ke dalam media produksi MS ditambah IAA dan BAP 1 mg/l dan sukrosa 40 g/l. Kultur kalus ini kemudian diperlakukan dengan menambahkan spora dari *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus oligosporus* dan *Aspergillus niger* sebagai elisitor, masing-masing satu ose, dan diletakkan di samping kalus (tidak boleh bersinggungan dengan kalus). Setiap

satu minggu disubkultur dan setelah 4 minggu dipanen. Biomassa yang diperoleh dikeringkan dan ditimbang, kemudian diekstraksi menggunakan metanol dan kloroform untuk mendapatkan alkaloid total. Untuk mengetahui ada/tidaknya alkaloid vinkristina dalam sampel digunakan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan pembanding vinkristina standar dan eluen kloroform : aseton : dietilamin (50:40:10). Hasilnya dilihat dengan penampak noda lampu uv pada panjang gelombang 254 nm dan pereaksi Dragendorff.

Dari hasil KLT nampak bahwa dari ke empat perlakuan (termasuk kontrol), tiga sampel terdeteksi bercak (noda) coklat tua yang identik dengan noda dari vinkristina standar dengan harga Rf yang sama yaitu 0,91, tetapi intensitas dan luas noda berbeda. Bila dibandingkan secara kualitatif dengan mengukur diameter noda didapatkan kadar vinkristina kalus *C. roseus* berturut-turut dari yang tertinggi adalah pada perlakuan dengan elisitor *R. oligosporus*, *Pseudomonas*, dan tanpa elisitor. Sedangkan pada perlakuan dengan elisitor *A. niger* tidak terdeteksi adanya vinkristina.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah (1) elisitor *R. oligosporus* dan *Pseudomonas* sp. mampu mempengaruhi pembentukan alkaloid vinkristina kalus *C. roseus* (L.) G.Don, (2) elisitor *A. niger* tidak mampu mempengaruhi pembentukan alkaloid vinkristina, (3) dari ketiga macam elisitor tersebut yang menginduksi alkaloid vinkristina paling banyak adalah *R. oligosporus*.

Dari hasil penelitian ini diperoleh bahwa pada pemberian elisitor *Aspergillus niger* didapatkan kadar alkaloid yang tinggi tetapi tidak dijumpai adanya alkaloid vinkristina. Hal ini perlu diteliti lebih lanjut untuk mengetahui apakah jenis alkaloid yang terdapat dalam kalus *C. roseus* yang diberi elisitor *Aspergillus niger*.

(L.P. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga;
No. Kontrak 068/P2IPT/DPPM/98/LITMUD/V/1998, 20 Mei 1998)

SUMMARY

THE INFLUENCE SOME ELICITOR TOWARD THE FORMATION OF VINCRISTINE ALKALOID ON CALLUS *Catharanthus roseus* (L.) G. Don CULTURE (Y. Sri Wulan Manuhara, Mulyadi Tandjung, Edy Setiti Wida Utami, 1999, 41 pages)

Catharanthus roseus (L.) G. Don contain many indol alkaloid that useful as an anti-tumor. Among of 90 alkaloids type that found on *C. roseus* there are more than 20 kinds of indol alkaloids that can be killed the cancer, particularly on leucemi and lymphoma malignant, that are vinblastine and vincristine. Some of environment factors like the interaction of plant cell with other organism (bacteria, fungus, insect, etc.) may influence the stimulate the formation of secondary metabolism is called elicitor.

What kind of micro-organism that have role as biology elicitor in formatting of vincristine on callus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don ?

The objective of this research is to know the influence of some elicitor toward the formation of vincristine alkaloid on callus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

The research consist of two stages, (1) callus culture with a treatment, and (2) extraction and isolation of alkaloid. Callus culture initially grown on MS media added with 2,4-D and BAP 1 mg/l. After 4 weeks, it is subculture in IAA and BAP 1 mg/l and sucrose 40 g/l. This callus culture then treated by adding spora *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus niger* as elicitor, each of them is one ose, and put near callus (not contact with callus). Every one week, it is made subculture and after 4 weeks is harvest. The biomassa that gained is dried off and weighed, then extracted by using methanol and chloroform to gain total alkaloid. To know there is a vincristine alkaloid or not in the sample, it is used thin layer chromatography (TLC) and also use standard vincristine and eluen chloroform : acetone : dietilamine (50:40:10) as comparison. The result is saw by uv lamp on the 254 nm wave length and Dragendorf reagent.

From the TLC result, it is showed that from the four treatments (including control), three samples is detected a black-brown spot that identically with a spot from standard vincristine with the same Rf value, that is 0,91, but the intensity and spot wide is different. If compare qualitatively by measuring the spot diameter, it can be gained a content of vincristine callus *C. roseus*, respectively, from the higher with elicitor treatment, are *R. oligosporus*, *Pseudomonas* sp., and without elicitor. Where as treatment with *A. niger* elicitor, it can be gained no vincristine.

The conclusion of this research are (1) *R. oligosporus* and *Pseudomonas* sp. elicitor able to affect the formation of vincristine alkaloid callus *C. roseus* (L.) G. Don, (2) *A. niger* elicitor cannot able to influence the formation of vincristine alkaloid, (3) from these three elicitors the most induction of vincristine alkaloid is *R. oligosporus*.

From the result of this research, if is gained that in giving *Aspergillus niger* elicitor there is high alkaloid content, not vincristine alkaloid. This is need a further examination to know what is the alkaloid in *C. roseus* callus that gave by *Aspergillus niger* elicitor.

(Rest. Inst. Faculty Of Matematic And Natural Science Airlangga University;
Contract No : 068/P2IPT/DPPM/98/LITMUD/V/1998, May 20, 1998)

KATA PENGANTAR

Berkat rahmat Tuhan Yang Maha Esa, akhirnya laporan penelitian ini dapat diselesaikan. Penelitian ini dilakukan dengan maksud untuk mengetahui pengaruh beberapa macam elisitor terhadap pembentukan alkaloid vinkristina pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan terutama kepada :

1. Pimpinan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
2. Pimpinan FMIPA Universitas Airlangga, Ketua Jurusan Biologi dan Kepala Laboratorium Biologi Reproduksi
3. Rekan-rekan dan semua pihak yang telah membantu kami selama penelitian hingga tersusunnya laporan ini.

Kami menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari kesempurnaan, meskipun demikian kami berharap semoga penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang kultur jaringan dan tumbuhan obat.

Surabaya, Maret 1999

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Permasalahan	01
1.2. Rumusan Masalah	04
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
1.3. Tinjauan Umum <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	05
1.4. Kultur Jaringan Tumbuhan	07
1.5. Produksi Alkaloid Melalui Kultur Jaringan	08
1.6. Produksi Indol Alkaloid	12
1.7. Elisitor dan Mekanisme Kerjanya	13
1.8. Metode Elisitasi	16
1.9. Tinjauan Umum <i>Rhizopus oligosporus</i>	19
1.10. Tinjauan Umum <i>Aspergillus niger</i>	20
1.11. Tinjauan Umum <i>Pseudomonas sp.</i>	21
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	12
BAB IV. METODE PENELITIAN	
1.12. Waktu dan Tempat Penelitian	23
1.13. Bahan Penelitian	23
1.14. Cara Kerja	23
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	35
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Harga, sumber tanaman, dan perolehan produk dengan metode bioteknologi dari beberapa alkaloid	09
Tabel 5.1. Indeks pertumbuhan (IP), kadar alkaloid total dan hasil uji KLT vinkristina pada kultur kalus <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G.Don pada berbagai perlakuan	28

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur vinkristina dan biosintesis alkaloid katarantina dan vindolina	06
Gambar 5.1. Kultur kalus <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G.Don	27
Gambar 5.2. Hasil analisis kualitatif vinkristina kalus <i>Catharanthus roseus</i> (L.)G.Don pada berbagai perlakuan dengan KLT	29

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Saat ini penelitian dalam bidang bahan alam nabati mengalami banyak kemajuan. Hal ini disebabkan adanya kesadaran manusia untuk kembali ke alam (*back to nature*), artinya bahwa bahan alam khususnya nabati mempunyai banyak manfaat bagi manusia, yaitu selain sebagai bahan makanan juga diperlukan sebagai bahan baku obat-obatan.

Catharanthus roseus (L.) G.Don mengandung bermacam-macam alkaloid indol yang berguna sebagai anti tumor. Evans (1989) menyatakan bahwa di antara 90 jenis alkaloid yang terdapat pada *C. roseus* terdapat lebih kurang 20 macam alkaloid indol (*dimeric indol alkaloid*) yang dapat mematikan kanker terutama pada leukemia dan *lymphoma malignant*, yaitu vinblastina dan vinkristina.

Petiard (1980) menyatakan bahwa vinblastina dapat menekan aktivitas mitosis sel. Hal ini dibuktikannya dengan perlakuan vinblastina sulfat terhadap sel-sel kanker darah tikus secara *in vitro*, dan diketahui bahwa senyawa tersebut dapat menghambat aktivitas mitosis sel-sel kanker darah. Menurut Evans (1989) vinkristina sulfat merupakan bahan sitostatik yang digunakan terutama untuk pengobatan leukemia pada anak-anak. Tetapi menurut Verpoorte *et al.*, 1993 sampai saat ini usaha mendapatkan alkaloid dimerik vinblastina dan vinkristina melalui kultur sel *C. roseus* belum tercapai. Hanya melalui kultur pucuk atau tunas (Miura *et al.*, 1988) dan kadang-kadang kultur kalus (Hirata *et al.*, 1989) kedua alkaloid tersebut dapat dideteksi.

Senyawa vinkristina pada *C. roseus* yang telah diketahui bersifat antineoplastik dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan penyakit kanker di Indonesia, mengingat saat ini jumlah penderita kanker cenderung meningkat. Tetapi kandungan alkaloid vinkristina hanya 0,0002% dari total alkaloid yang dijumpai pada tanaman *C. roseus*. Selain itu harga vinkristina mencapai US\$ 25.200/gram (Verpoorte *et al.*, 1993). Oleh karena itu diperlukan usaha untuk mendapatkan senyawa tersebut dalam jumlah besar.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk meningkatkan konsentrasi vinkristina dan vinblastina, di antaranya Miura *et al.* (1988) mendapatkan vinblastina melalui kultur pucuk *C. roseus* dan Hirata *et al.* (1989) juga memperoleh vinblastina melalui kultur tunas. Sedangkan Manuhara (1994) mendapatkan vinkristina pada kultur kalus *C. roseus* dengan perlakuan penambahan kadar sukrosa, nitrat, dan fosfat pada medium MS (Murashige-Skoog).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi biosintesis metabolit sekunder antara lain adalah faktor diferensiasi, ada tidaknya prekursor, faktor lingkungan, dan ada tidaknya elisitor. Gotlieb (1990) menyatakan bahwa adanya beberapa faktor lingkungan seperti adanya interaksi sel tanaman dengan organisme lain (bakteri, jamur, serangga dan lain-lain) dapat mempengaruhi proses pembentukan metabolit sekunder. Metabolit sekunder tersebut baru terbentuk atau kadarnya meningkat setelah sel tanaman mengalami gangguan dari luar. Metabolit sekunder tersebut dikenal sebagai fitoaleksin dan semua yang merangsang pembentukan fitoaleksin tersebut secara umum disebut elisitor. Berdasarkan Kongres Internasional Kultur Jaringan dan Sel VI pada tahun 1986, istilah elisitor hanya digunakan untuk senyawa yang berasal dari jasad biologi (Soegihardjo, C.J., 1993).

Jawaban suatu kultur sel terhadap berbagai jenis mikroba dapat diteliti, karena tidak ada petunjuk untuk memperkirakan organisme mana yang dapat menghasilkan elisitasi. Pemilihan mikroba seyogyanya diambil dari berbagai tipe kapang dan tidak perlu yang bersifat patogen terhadap tumbuhan, tetapi juga dapat dipilih yang bersifat saprofit (Lilert, 1987).

Untuk merangsang terbentuknya metabolit sekunder, kultur kalus biasanya di subkulturkan pada media segar 1-4 minggu setelah penaburan, sedangkan pada kultur suspensi sel subkultur dilakukan setelah 3-14 hari setelah diinokulasi dengan mikroorganisme. Pada kultur kalus dapat dilaksanakan dengan menginfeksi mikroorganisme secara langsung pada eksplan atau mikroorganisme diletakkan berdampingan dengan kalus, tetapi harus dihindarkan bersinggungan langsung. Metode ini digunakan terutama jika faktor pengimbas yang terdapat dalam mikroba bersifat tidak tahan pemanasan (termolabil), misalnya enzim yang dapat membebaskan senyawa elisitor sesungguhnya.

Beberapa contoh publikasi yang melaporkan adanya pembentukan fitoaleksin dalam sel tanaman antara lain induksi akumulasi asam rosmarinat pada kultur *Orthosiphon aristatus* oleh ekstrak ragi sebagai elisitor (Sumaryono, 1985). Penelitian lain yang melaporkan hal sejenis adalah penambahan miselia jamur dapat meningkatkan kandungan diosgenin pada kultur suspensi *Dioscorea deltoidea* (Rokem, 1985).

Pada penelitian ini akan dicoba beberapa macam elisitor dari bakteri dan jamur/kapang untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pembentukan alkaloid vinkristina pada kultur kalus *C. roseus*.

1.2. Rumusan Masalah

Mikroorganisme manakah yang berperan sebagai elisitor biologis dalam pembentukan alkaloid vinkristina pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.) G.Don ?

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Tanaman ini berasal dari Amerika Tengah dan di Indonesia sudah tidak asing lagi, karena dikenal sebagai tanaman hias. Biasanya ditanam di halaman rumah atau kadang-kadang tumbuh liar (Anonim, 1980).

Catharanthus roseus (L.) G. Don berupa semak menahun, tegak, banyak bercabang dan tingginya mencapai 120 cm. Batangnya berkayu pada bagian bawahnya, dan bergetah putih. Daunnya bertangkai pendek, tersusun berhadapan kecil-kecil, berbentuk bulat telur atau bulat memanjang dengan pangkal menyempit dan ujung tumpul. Bunganya tumbuh di ujung tangkai dan ketiak daun, berupa bunga tunggal dan letaknya di tengah. Mahkota bunga berbentuk terompet, pada bagian ujung melebar terbagi dalam dan berbentuk bulat telur terbalik. Buahnya berupa buah polong, bijinya banyak dan berwarna hitam. Tanaman ini dapat diperbanyak dengan biji, stek batang atau akar (Van Steenis, 1975; Anonim, 1980; Wijayakusuma *et al.*, 1994).

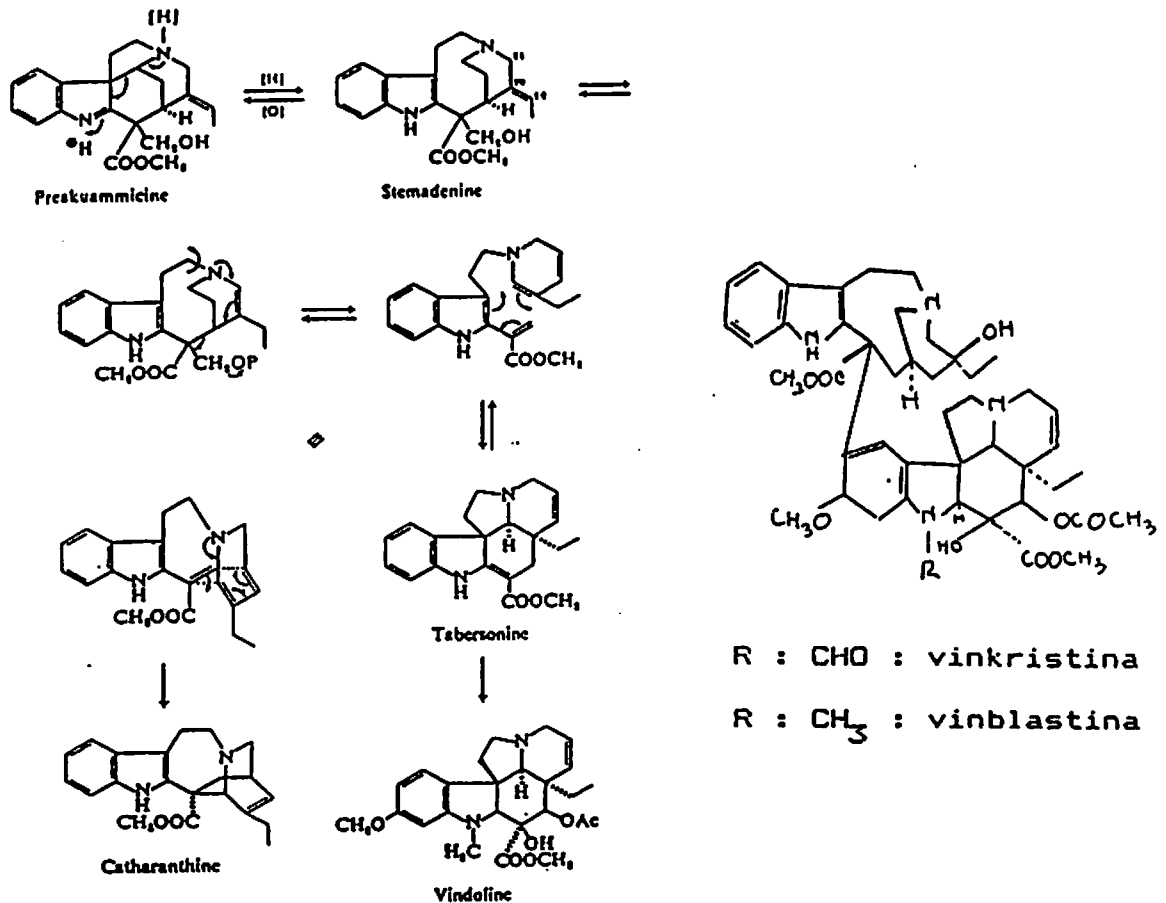
Selain dikenal sebagai tanaman hias *C. roseus* juga dikenal sebagai tumbuhan obat untuk tumor, kanker, dan diabetes. Di India, Filipina, dan Australia akar tumbuhan ini digunakan sebagai bahan obat untuk diabetes (Anonim, 1980; Evans, 1989; Wijayakusuma, 1994).

Menurut Evans (1989) dan Wijayakusuma *et al.* (1994) *C. roseus* mengandung lebih kurang 90 jenis alkaloid, beberapa contoh yaitu loknerina, katarantina, tetrahidroalstonina, dan vindolina mempunyai efek hipoglikemi (menurunkan kadar gula darah) sedangkan ajmalisina dan serpentina berkhasiat

menurunkan tekanan darah. Diantara 90 jenis alkaloid tersebut terdapat 20 jenis alkaloid dimerik yang mempunyai aktivitas antineoplastik diantaranya adalah leukokristina (vinkristina), vinkaleukoblastina (vinblastina). Vinblastina tersusun atas alkaloid katarantina dan dihidroindol alkaloid vinblastina.

Alkaloid total yang diperoleh dari kultur sel *C. roseus* lebih kurang 0,1-1,5% per gram berat kering sel. Sedangkan kadar vinkristina lebih kurang 0,0002%. Oleh karena itu diperlukan bahan baku dalam jumlah besar untuk mendapatkan jumlah alkaloid yang diinginkan (Evans, 1989).

Struktur vinkristina dan biosintesis alkaloid katarantina dan vindolina adalah sebagai berikut.



Gambar 2.1. Struktur vinkristina dan biosintesis alkaloid katarantina dan vindolina (Torzell, 1983; Fujita *et al.*, 1990)

2.2. Kultur Jaringan Tumbuhan

Aplikasi kultur jaringan tumbuhan dapat digunakan untuk memproduksi senyawa-senyawa kimia yang mempunyai arti ekonomi, karena sel-sel yang beradaptasi mampu mengadakan pembelahan dan penambahan plasma untuk membentuk massa sel yang tidak terdeferensiasi yang disebut kalus, serta mensintesis senyawa-senyawa kimia seperti yang dibuat oleh tanaman induknya (suryowinoto, 1985).

Menurut Dods dan Robert, 1982 kalus merupakan massa sel tak berbentuk yang terdiri dari sel-sel parenkim yang tersusun longgar dan timbul akibat proliferasi sel-sel jaringan induk atau eksplan. Terjadinya kalus adalah di tempat irisan yang bertujuan untuk menutup luka. Selain itu kalus juga terbentuk pada bagian permukaan yang tidak berhubungan dengan media. Biasanya pertumbuhan kalus yang cepat terjadi di daerah perifer.

Menurut Suryowinoto, 1985 penerapan budidaya jaringan untuk menghasilkan metabolit sekunder lebih menguntungkan dibandingkan metode konvensional, karena metode budidaya jaringan mempunyai beberapa keuntungan yaitu, (1) dapat membentuk senyawa berkhasiat dalam kondisi terkontrol, (2) dapat diperbanyak dan menghasilkan metabolit sekunder yang khas, (3) pembentukan metabolit sekunder dapat ditingkatkan dengan memanipulasi media, (4) produk yang dihasilkan relatif konsisten baik kualitas maupun kuantitas, (5) dapat membentuk senyawa baru yang tidak dijumpai pada tanaman induknya dan (6) tidak tergantung pada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim dan musim.

Sebagai contoh pada tanaman berumur panjang seperti kina, kultur jaringan untuk menghasilkan metabolit sekunder dapat menghemat waktu, lahan, tenaga dan

biaya karena metabolit sekunder dari tanaman yang berupa eksplan terlebih dahulu dijadikan kalus, dari kalus kemudian diambil senyawa alkaloidnya yaitu kinina.

Metode kultur jaringan untuk menghasilkan metabolit sekunder dapat diperoleh melalui kultur kalus maupun kultur suspensi sel. Menurut Yamada, 1984 senyawa-senyawa hasil metabolit sekunder yang mempunyai nilai ekonomi seperti pigmen, alkaloid dan steroid telah banyak dikembangkan dengan metode kultur suspensi sel.

2.3. Produksi Alkaloid Melalui Kultur Jaringan

Saat ini, dari seluruh metabolit sekunder yang telah diketahui kurang lebih ada 20% (sekitar 16.000) diklasifikasikan sebagai alkaloid. Beberapa alkaloid yang mempunyai aktivitas biologis telah dilaporkan, tetapi hanya kurang lebih 30 macam yang diproduksi untuk kepentingan komersial. Sebagian besar berupa obat-obatan, tetapi ada beberapa yang digunakan sebagai bahan penyedap dan senyawa model untuk studi farmakologi dan rancangan obat. Alkaloid-alkaloid ini dikualifikasikan sebagai senyawa kimia yang berkhasiat khusus, karena volume produksi di seluruh dunia terbatas, misalnya alkaloid kinina dan kinidina diproduksi 300-500 ton per tahun, ajmalisina 3600 kg per tahun, sedangkan senyawa-senyawa seperti vinblastina dan vinkristina hanya beberapa kg. Hal ini disebabkan jumlah tanaman yang dibutuhkan untuk bahan ekstraksi sangat sedikit dibandingkan dengan jumlah tanaman pertanian. Sebagai contoh, diperlukan 5.000 - 10.000 ton kulit kayu *Cinchona* untuk ekstraksi kinina dan kinidina, serta dibutuhkan 200 - 300 ton akar *Catharanthus roseus* untuk menghasilkan ajmalisina. Oleh karena itu alkaloid tertentu dapat mencapai beberapa ribu dolar US (tabel 1) (Verpoorte *et al.*, 1993).

Tabel 2.1. Harga, sumber tanaman, dan perolehan produk dengan metode bioteknologi dari beberapa alkaloid

Alkaloid	Sumber tanaman	Harga AS \$/gram	Perolehan
Ajmalisina	<i>Catharanthus roseus</i>	37,00	0,2 g/l
Vinblastina	<i>C. roseus</i>	10.530,00	sesepora
Vinkritina	<i>C. roseus</i>	25.200,00	sesepora
Ajmalina	<i>Rauwolfia</i> sp.	10,00	0,04 g/l
Reserpina	<i>Rauwolfia</i> sp.	8,30	0,002 g/l
Resinamina	<i>Rauwolfia</i> sp.	18,30	*
Vinkamina	<i>Vinca</i> sp.	19,70	3,3 g/l
Kinina	<i>Cinchona</i> sp.	0,50	sesepora
Kinidina	<i>Cinchona</i> sp.	0,90	sesepora
Kafeina	<i>Coffea</i> sp., <i>Thea</i> sp.	0,08	0,48 g/l
Teobromina	<i>Theobroma</i> sp.	0,60	*
Atropina	<i>Atropa beladonna</i> <i>Datura</i> sp. <i>Hyoscyamus</i> sp.	3,50	0,1-0,2 g/l
Berberina	<i>Coptis japonica</i>	11,00	7 g/l
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	340,00	0,25 g/l
Kodeina	<i>P. somniferum</i>	17,00	0,25 g/l
Nikotina	<i>Nicotiana</i> sp.	1,00	0,36 g/l
Kolkisina	<i>Colchicum autumnale</i>	50,00	0,0006 % berat kering

Sumber : Verpoorte et al., 1993

Alkaloid tersebut di atas, saat ini diproduksi melalui ekstraksi dari bahan tanaman yang telah dibudidayakan atau kadang-kadang masih diambil dari tanaman yang tumbuh liar.

Ada beberapa masalah sehubungan dengan metode produksi, salah satu diantaranya yaitu bahan tanamannya, karena tanaman memerlukan waktu pertumbuhan beberapa tahun sebelum siap dipanen (contoh, kulit kayu *Cinchona*), dan pengambilan dapat membahayakan kelestarian spesies.

Pada produksi dalam skala industri faktor kestabilan dan produksi sel tanaman adalah faktor yang penting. Untuk mencapai kondisi tersebut ada dua pendekatan yaitu (1) skreening dan seleksi pertumbuhan sel, (2) optimalisasi faktor pertumbuhan dan komposisi media produksi (Morris, 1987 dan Verpoorte et al., 1993).

Skreening dan seleksi dilakukan untuk mendapatkan kurva pertumbuhan yang paling baik. Hal ini dapat diperoleh dengan menggunakan tanaman yang subur, sesudah itu produksi senyawa-senyawa yang penting ditentukan, kemudian kultur sel yang memproduksi paling baik diseleksi. Tetapi produksi senyawa yang tinggi pada tanaman tidak berkorelasi dengan produksinya pada kultur sel, seperti ditunjukkan pada produksi kultur sel *Coptis japonica* dimana pada kenyataannya produksi paling tinggi didapatkan tanaman yang rendah produksinya (Sato dan Yamada, 1984).

Proses seleksi dilakukan untuk mendapatkan kondisi dimana hanya tipe-tipe sel tertentu yang diinginkan yang dapat hidup. Sebagai contoh sel *C. roseus* tumbuh dengan baik pada media yang mengandung senyawa toksik 4-metil triptofan untuk mendapatkan kultur sel yang mempunyai produksi alkaloid lebih tinggi. Hanya sel-sel yang mengandung dekarboksilase tinggi yang dapat hidup, karena mampu mengubah 4-metil triptofan (bahan seleksi) menjadi 4-metil triptamin sehingga sifat toksiknya berkurang. Seleksi kultur sel menghasilkan produksi triptamin yang lebih tinggi, tetapi hanya dalam satu kasus yang menyebabkan produksi indol alkaloid terpenoid juga meningkat (Sasse et al., 1983 dalam Verpoorte et al., 1993).

Pendekatan lain yang penting untuk meningkatkan produksi adalah memperbaiki kondisi pertumbuhan dan produksi, yang meliputi variasi komposisi media diuji untuk meningkatkan biomassa dan produk metabolit sekunder dalam

kultur. Tetapi dalam beberapa kasus produksi tidak paralel dengan pertumbuhan. Oleh karena itu sistem dua tahap sering digunakan. Tahap pertama ditumbuhkan pada media optimal untuk pertumbuhan, kemudian dipindahkan ke dalam media produksi. Sistem ini telah dilaporkan oleh Zenk *et al.* dan Knobloch *et al.* Untuk menginduksi ajmalisina dalam *C. roseus* (Knobloch *et al.*, 1982 dalam Verpoorte *et al.*, 1993).

Perbandingan bermacam-macam media yang digunakan untuk menghasilkan alkaloid melalui kultur sel *C. roseus* telah banyak dilakukan. Pengaruh pemberian fitohormon terhadap perolehan alkaloid ditunjukkan oleh rata-rata akumulasi alkaloid dan kemampuan sel untuk melakukan siklus hidup. Faktor yang mendasari induksi alkaloid adalah kadar zat pengatur tumbuh 2,4-D dalam media. Pada sebagian besar kasus, pengurangan kadar zat pengatur tumbuh 2,4-D pada media produksi akan meningkatkan produksi alkaloid. Penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D pada media produksi menghambat biosintesis alkaloid (Morris, 1986).

Cahaya adalah faktor yang dapat meningkatkan produksi untuk kultur sel tertentu. Tetapi untuk produksi skala besar dalam bioreaktor kondisi tersebut sulit dilaksanakan, karena membutuhkan biaya yang besar. Selain itu faktor aerasi dan kombinasi hormon yang digunakan juga mempengaruhi produksi. Cahaya, selain mempengaruhi pertumbuhan juga mempengaruhi produksi alkaloid. Pengaruh cahaya terhadap pertumbuhan kalus dinyatakan dengan berat segar dan berat kering. Kultur yang diinkubasi dengan cahaya terus menerus menghasilkan rata-rata berat segar lebih tinggi daripada di dalam gelap. Sedangkan pengaruh cahaya terhadap produksi alkaloid berbeda-beda. Di dalam kondisi gelap ajmalisina dan serpentina diproduksi lebih tinggi dibandingkan pada kondisi terang (Morris, 1996).

2.4. Produksi Indol Alkaloid

Sebagian besar bioteknologi sel tanaman yang dikerjakan untuk menghasilkan indol alkaloid adalah *C. roseus* dan *Rauwolfia sp.* Pada kenyataannya *C. roseus* telah dikembangkan sebagai model utama untuk studi bioteknologi sel tanaman, meskipun banyak usaha untuk mendapatkan dimeric alkaloid vinblastina dan vinkristina melalui kultur sel *C. roseus* belum tercapai. Hanya dalam kultur pucuk atau tunas (Miura *et al.*, 1988 dan Hirata *et al.*, 1989) dan kadang-kadang kultur kalus (Miura *et al.*, 1988) kedua indol alkaloid tersebut dapat dideteksi. Salah satu alkaloid monomerik dari biosintesis dimer yaitu katarantina diproduksi dalam kultur suspensi sel. Vindolina (alkaloid yang merupakan bagian dari dimerik alkaloid) diproduksi hanya pada jaringan yang telah terdeferensiasi. Dengan mengisolasi enzim sederhana dari kultur sel *C. roseus* dimungkinkan untuk menghasilkan anhydrovinblastina dari katarantina dan vindolina (Verpoorte *et al.*, 1993). Bahkan perolehan lebih baik didapatkan dengan menggunakan enzim peroksidase (Doireau *et al.*, 1987 dan Goodbody *et al.*, 1988).

Meskipun kultur sel *C. roseus* tidak menghasilkan alkaloid dimerik, tetapi menghasilkan ajmalisina dan serpentina. Pada kenyataannya sebagian besar kultur sel tanaman *C. roseus* ditujukan untuk produksi alkaloid tersebut, yang digunakan untuk pengobatan hipertensi.

Beberapa penulis telah mempelajari kultur sel *C. roseus* dalam bioreaktor. Tetapi pada kondisi ini, sel hanya menghasilkan sedikit alkaloid. Imobilisasi sel *C. roseus* telah dilaporkan sebagai cara untuk memperbaiki produktivitas. Kultur bulu akar (*hairy roots*) *C. roseus* juga telah dilaporkan dapat menghasilkan ajmalisina dan serpentina, walaupun rata-rata pertumbuhannya sangat rendah. Metode pemberian

elisitor dilaporkan juga dapat meningkatkan triptamin dan ajmalisina (Verpoorte *et al.*, 1993).

Kultur sel *Rauwolfia* telah terbukti sebagai salah satu penghasil terbaik terpenoid indol alkaloid. Secara komersial ajmalisina diproduksi dalam kultur suspensi sel beberapa spesies *Rauwolfia*. Tingkat produksi tertinggi (0,5% berat kering) dilaporkan pada kultur sel *Rauwolfia serpentina*. Stockigt *et al.*, 1981 (Verpoorte *et al.*, 1993) mempelajari produksi alkaloid dari beberapa spesies *Rauwolfia*. Mereka menemukan bahwa alkaloid utama yang dihasilkan adalah raukafisin, suatu glikoalkaloid yang merupakan senyawa antara pada biosintesis ajmalisina. Pada *R. serpentina* produksi glikoalkaloid ini mencapai 1,6 g/l bila di subkultur pada medium induksi (Schubel *et al.*, 1989).

Reserpina dan resinamina, dua alkaloid lain yang saat ini diisolasi dari *Rauwolfia* pada skala industri, hanya menghasilkan alkaloid di atas dalam jumlah sedikit melalui kultur sel. Tingkat produksi tertinggi yang dilaporkan adalah 0,1% berat kering pada kultur suspensi sel *R. serpentina* (Yamamoto dan Yamada, 1987).

2.5. Elisitor dan Mekanisme Kerjanya

Senyawa aktif yang bersifat antibiotik, yaitu metabolit sekunder yang ditimbun oleh tumbuhan sebagai jawaban atas serangan mikroba disebut fitoaleksin. Penimbunan dalam tumbuhan ini mengakibatkan tumbuhan tahan terhadap senyawa kimia yang berasal dari mikroba yang bersangkutan. Hal ini merupakan sistem pertahanan tumbuhan terhadap mikroba tersebut dan telah ditunjukkan pada beberapa varietas dari berbagai jenis tanaman tertentu.

Bila dipelajari lebih lanjut, pengimbasan penimbunan fitoaleksin karena adanya senyawa yang berasal dari patogen, merupakan sebab timbulnya jawaban yang serupa dalam tanaman seperti pada patogen itu sendiri. Senyawa tersebut dinamai elisitor, sedangkan senyawa yang diturunkan oleh tanaman disebut elisitor endogen dan senyawa yang dikeluarkan oleh mikroba disebut elisitor biotik.

Tekanan (stres) fisikawi dan kimiawi seperti radiasi sinar ultra violet, fungisida, antibiotika, panas, logam berat serta kadar garam tinggi yang dapat mengakibatkan penimbunan metabolit sekunder disebut elisitor abiotik. Tetapi berdasarkan Kongres Internasional Kultur Jaringan dan Sel ke VI tahun 1986, istilah elisitor hanya digunakan untuk senyawa yang berasal dari jasad biologi.

Berdasarkan percobaan yang dilakukan selama ini ternyata ada empat jenis interaksi dan pengenalan tumbuhan terhadap elisitor, yaitu : (1) pembebasan secara langsung elisitor oleh mikroba dan pengenalan oleh tumbuhan, (2) enzim mikroba membebaskan komponen dinding sel tanaman, (3) enzim tumbuhan membebaskan komponen dinding sel mikroba, dan (4) senyawa elisitor yang bersifat endogen (Eilert, 1987).

1. Pembebasan elisitor dari mikroba

Elisitor yang dibebaskan ini langsung dikeluarkan oleh mikroba dan kemudian tumbuhan mengenalinya, sehingga terjadi proses elisitasi, yaitu biosintesis dan penimbunan fitoaleksin. Reseptor yang merupakan titik tangkap elisitor tersebut diduga terletak pada membran plasma.

2. Enzim mikroba membebaskan komponen dinding sel tumbuhan.

Dalam peristiwa tersebut yang bertindak sebagai elisitor adalah komponen dinding sel tumbuhan. Suatu enzim dalam *Erwina carotopora* dan *Rhizopus stolonifer*

yang disebut asam endopoligalakturonase bertindak sebagai enzim pektinolitik. Enzim ini ternyata juga terdapat dalam berbagai kapang dan ternyata dapat mengimbas pembentukan fitoaleksin melalui mekanisme ini.

3. Enzim tumbuhan membebaskan komponen dinding sel mikroba

Komponen dinding mikroba bertindak sebagai elisitor dan mengimbas pembentukan fitoaleksin dalam sel tumbuhan. Contoh mekanisme kerja jenis ini ditunjukkan oleh Hadwiger dan Beckman (1980), enzim ini membebaskan khitosan dari dinding *Fusarium*. Disamping itu Keen dan Yoshikawa (1983) berhasil mengisolasi enzim β -1,3-endoglukanase dari kedelai yang dapat membebaskan komponen aktif sebagai elisitor dari dinding sel *Phytophthora*.

4. Senyawa elisitor yang bersifat endogen

Senyawa ini terdapat dalam tumbuhan, dibentuk dan dibebaskan oleh sel tumbuhan sebagai jawaban atas rangsangan mikroba, bahkan senyawa ini dapat diekstraksi secara buatan. Senyawa tersebut diidentifikasi sebagai elisitor yang berasal dari dinding sel karena pengaruh enzim dari kapang (mirip dengan butir 2). Hahn *et al.* (1981) mendapatkan suatu oligosakarida yang memiliki aktivitas sebagai elisitor. Gula ini berasal dari dinding sel tumbuhan dan dibebaskan dengan cara dihidrolisis asam secara parsial atau bahkan dengan cara ekstraksi sederhana dengan air panas.

Pembebasan metabolit yang memiliki bioaktivitas sebagai elisitor terjadi setelah kerusakan sel. Kurosaki *et al.* (1985) melaporkan bahwa senyawa yang memiliki kemampuan untuk mengimbas pembentukan 6-metoksimelein dalam kultur sel wortel (*Daucus carota*) yang diperoleh dengan hidrolisis parsial atau oleh aktivitas enzim endopoligalakturonidase atau endopektinoliase yang dapat mencerna sel wortel.

Hidrolisat asam dinding sel daun sledri (*Apium graveolens*) atau kultur sel in vitro dapat mengimbas pembentukan furanokumarin dalam kultur sel sledri. Pembentukan inhibitor protease dalam kultur sel tomat diimbas oleh penambahan suatu polisakarida yang kaya akan asam uronat dan dapat diekstraksi dan dimurnikan dari media kultur yang telah digunakan.

2.6. Metode Elisitasitasi

Dalam mempelajari interaksi antara tumbuhan inang dan mikroba, terdapat persoalan dalam pemilihan mikroba yang digunakan. Apabila perhatian dipusatkan pada pemicu sederhana untuk pembentukan metabolit sekunder, maka ada berbagai pilihan, yaitu sediaan virus, bakteri, ganggang hijau, tetapi yang sering digunakan adalah kapang dan ternyata beberapa diantaranya berhasil. Disamping itu dari bagian dari inokulum kapang yang dapat digunakan adalah konidiospora, zoospora, atau sporangia dan miselia, terutama apabila bertindak sebagai elisitor.

Jawaban suatu kultur sel terhadap berbagai jenis mikroba dapat diteliti, karena tidak ada petunjuk untuk memperkirakan organisme mana yang dapat menghasilkan elisitasi.

Kultur jaringan tanaman biasanya dapat disimpan dalam keadaan steril, akan tetapi infeksi-infeksi (kontaminan) karena tidak bebas seluruhnya dari mikroorganisme hidup perlu diperhatikan dengan alasan sebagai berikut, (a) untuk mempelajari kultur parasit sejati, (b) studi berbagai proses infeksi, (c) uji secara umum mengenai kerentanan dan ketahanan (resistensi), (d) uji ketahanan terhadap toksin, dan (e) perangsangan metabolisme sekunder dalam kultur sel atau pengimbasan terbentuknya fitoaleksin.

Pada umumnya, untuk menginduksi metabolit sekunder kultur kalus disubkulturkan ke media segar 1-4 minggu setelah penaburan, sedangkan pada kultur suspensi sel subkultur dilakukan setelah 3-14 hari sebelum diinokulasi dengan mikroorganisme. Meskipun hal itu berlaku umum, namun sangat penting untuk diketahui bahwa kokultur media kultur jaringan tanaman menjamin kelangsungan hidup mikroorganisme. Pada kultur kalus dapat dilaksanakan dengan menginfeksi mikroorganisme secara langsung pada eksplan atau mikroorganisme diletakkan berdampingan dengan kalus, tetapi persinggungan langsung harus dihindarkan.

Pada perlakuan pertama, jawaban pemicu diperlukan persinggungan langsung antara sel tumbuhan dengan inokulum. Tergantung dari masa inkubasi, persinggungan langsung dapat mengakibatkan kerusakan sel. Pemisahan jaringan tanaman dengan inokulum biasanya menjadi tak mungkin, sehingga menimbulkan kesulitan pada penetapan perubahan metabolik. Persoalan ini dapat dipecahkan pada metode kokultur, dimana mikroorganisme dijaga tetap terpisah dengan sel tumbuhan. Kokultur tanpa persinggungan langsung, hanya bakteri tak bergerak, khamir, atau jamur berbenang yang tumbuh lambat dapat dipilih. Antar aksi sangat mungkin terjadi karena adanya difusi senyawa dalam media dan lewat fase gas. Metode ini digunakan terutama jika faktor pengimbas yang terdapat dalam mikroba bersifat tidak tahan pemanasan (termolabil), misalnya enzim yang dapat membebaskan senyawa elisitor sesungguhnya. Mikroba tersebut akan bertindak sebagai elisitor secara berkesinambungan dan kerusakan sel akan terjadi sesedikit mungkin. Kokultur terpisah adalah metode untuk uji pendahuluan tentang interaksi dalam sebarang sistem kultur sel tanaman baru dengan mikroorganisme.

Kultur suspensi sel dapat dielisitasi secara sederhana dengan penambahan inokulum mikroba. Persinggungan antara dua organisme dan penyingkapan terhadap produk yang dieksresikan sangat intensif; akan tetapi persinggungan tersebut dapat terganggu dengan adanya pergerakan sel. Hal ini nampaknya kurang efektif bila dibandingkan dengan pada kultur kalus. Tipe interaksi kokultur ini merupakan salah satu metode yang banyak digunakan, karena kultur suspensi sel biasanya sel-selnya lebih homogen daripada kalus dan kadar inokulum dapat diatur dengan mudah.

Persinggungan secara langsung antara mikroba dan sel tanaman dapat dibuat lebih terjamin pada penjerapan kedua mikroorganisme dalam bentuk gel dalam sistem amobilisasi. Biasanya mikroorganisme diamobilisasi untuk menghindarkan berbagai gangguan pada pertumbuhan sel tumbuhan. Gel tersebut mungkin juga berpengaruh terhadap penyekatan produk dari sel tanaman yang dijerap. Namun demikian, dalam sistem sel amobil dapat dilakukan isolasi produk dengan cara sonifikasi atau permeabilisasi dengan pemberian pelarut organik. Dalam sistem sel amobil yang ideal adalah apabila metabolit sekunder yang dikehendaki diekskresikan ke medium. Sistem semacam itu dapat dilakukan secara berkesinambungan atau semikesinambungan.

Dalam sistem kokultur dengan mikroba hidup, efek sinergis dan penghambatan mungkin terjadi. Manfaat interaksi dengan daerah yang luas yang dialami dalam sistem kokultur dibarengi dengan kerugian bahwa sistem kokultur (terutama dengan kapang berbenang) dapat dengan mudah kehilangan keseimbangan dan sukar dikontrol, sehingga hasilnya terjadi kerusakan besar pada sel tanaman.

Penggunaan homogenat kultur mikroorganisme steril yang kompleks dapat menghindari masalah tersebut, disamping dapat memelihara interaksi yang mungkin dalam kisaran yang lebar. Penyediaan elisitor yang kompleks mudah diperoleh dengan

mengkulturkan mikroba yang dipilih dan sebaiknya dalam media kultur, selanjutnya setelah dihomogenisasi lalu bersama dengan media disteril dengan dipanaskan dalam autoklaf. Pada proses sterilisasi dalam autoklaf terjadi pembebasan senyawa yang bertindak sebagai elisitor. Akan tetapi senyawa yang bersifat tidak tahan pemanasan, misalnya enzim akan mengalami kerusakan. Hasil homogenat murni yang telah disaring, menghasilkan filtrat yang memiliki efek elisitasi meskipun aktivitasnya dikurangi dengan jumlah elisitor yang tidak larut dan masih tertinggal di dinding sel.

2.7. Tinjauan Umum *Rhizopus oligosporus*

Koloni jamur *Rhizopus oligosporus* berwarna abu-abu kecoklatan, diameter koloni lebih kurang 1mm. Sporangiofor soliter atau dalam kelompok dengan jumlah lebih dari 4, timbul sebagai hifa subhyalin berwarna kecoklatan. Rizoid pendek berdinding halus atau kasar berukuran panjang 1000 um dan berdiameter 10-18 um. Sporangia berbentuk globose, pada saat masak berwarna hitam kecoklatan, diameter 100-180 um. Kolumela globose sampai subglobose dengan apofisis berbentuk funnel. Sporangiofora bentuknya tidak teratur, globose, elips, panjang 7-10 um, mempunyai massa kecoklatan, bersel tunggal, berdinding halus. Klamidosporanya banyak, tidak berwarna tetapi bergranula. Tumbuh di Jepang, China dan Indonesia, diisolasi dari tempe (Samson, R.A. *et al.*, 1981).

Klasifikasi *Rhizopus oligosporus* menurut Tjitrosoepomo, G., 1979 adalah sebagai berikut.

Divisi : Thallophyta
 Subdivisi : Fungi
 Class : Phycomycetes
 Ordo : Zygomycetales
 Famili : Mucoraceae
 Genus : *Rhizopus*
 Species : *Rhizopus oligosporus*

2.8. Tinjauan Umum *Aspergillus niger*

Koloni jamur *Aspergillus niger* pada Czapek agar dengan suhu inkubasi 25°C selama 7 hari berdiameter 4-5 cm, bagian basal kompak dan berwarna putih atau kuning dengan permukaan dipenuhi dengan konidiofora berwarna coklat tua sampai hitam. Kepala konodia berbentuk radial. Konidiopfora berdinding halus, tidak berwarna atau kadang-kadang berwarna coklat. Vesikel berbentuk globose sampai subglobose dengan diameter 50-100 um. Konidia berbentuk globose sampai subglobose berdiameter 3,5 – 5 um, berwarna coklat (Samson, R.A. *et al.*, 1981).

Klasifikasi *Aspergillus niger* menurut Tjitrosoepomo, G., 1979 adalah sebagai berikut.

Divisi : Thallophyta
 Subdivisi : Fungi
 Class : Eumycetes
 Ordo : Plectascales
 Famili : Aspergillaceae
 Genus : *Aspergillus*
 Species : *Aspergillus niger*

2.9. Tinjauan Umum *Pseudomonas sp.*

Pseudomonas sp. adalah bakteri yang bersifat heterotrof, jarang yang bersifat autotrof fakultatif, sel-selnya seringkali bersifat oksidatif, kadang-kadang fermentatif. Beberapa spesies bakteri ini menimbulkan penyakit layu pada familia Solananceae dan pada kacang tanah dan juga menimbulkan penyakit pada kapas.

Klasifikasi *Pseudomonas sp.* menurut Tjitrosoepomo, G., 1979 adalah sebagai berikut :

- Divisi : Schizophyta
- Class : Schizomycetes
- Ordo : Pseudomonadales
- Subordo : Psudomonadinae
- Famili : Pseudomonadaceae
- Genus : *Pseudomonas*
- Species : *Pseudomonas sp.*

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh beberapa macam elisitor terhadap pembentukan alkaloid vinkristina pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.) G.Don.

3.2. Manfaat Penelitian

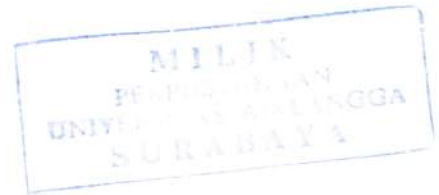
Dari hasil penelitian ini akan dapat diketahui jenis elisitor yang mampu mempengaruhi pembentukan alkaloid vinkristina, sehingga diharapkan produksi alkaloid ini dapat ditingkatkan.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan September 1998 sampai dengan bulan Februari 1999 di Laboratorium Biologi Reproduksi bagian Kultur Jaringan Jurusan Biologi dan Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga Surabaya.



4.2. Bahan Penelitian

Sebagai bahan utama penelitian ini adalah kultur kalus yang diperoleh dengan cara subkulturasi dari kultur kalus dari Laboratorium Biologi Reproduksi bagian Kultur Jaringan jurusan Biologi FMIPA UNAIR.

Elisitor yang digunakan dari golongan jamur adalah *Aspergillus niger* dan *Rhizopus oligosporus*, sedangkan dari golongan bakteri adalah *Pseudomonas* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UNAIR.

4.3. Cara Kerja

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap, (1) kultur kalus dengan perlakuan, (2) ekstraksi dan isolasi alkaloid

A. Tahap 1 Kultur kalus

Kultur kalus mula-mula ditumbuhkan pada media induksi MS ditambah 2,4-D dan BAP masing-masing 1 mg/l. Setelah 4 minggu di subkultur ke dalam media produksi MS ditambah IAA dan BAP masing-masing 1 mg/l dengan kadar sukrosa 40 g/l.

Kultur kalus ini kemudian diperlakukan dengan menambahkan spora dari *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger* masing-masing satu ose, dan diletakkan di samping kalus (tidak boleh bersinggungan dengan kalus). Setiap satu minggu kalus disubkultur dan dipanen setelah berumur 4 minggu.

Biomassa yang diperoleh dikeringkan dalam lemari pengering dengan udara mengalir pada suhu kurang lebih 45°C selama 48 jam.

Pembuatan media untuk induksi kalus dan media untuk produksi alkaloid vinkristina dilakukan dengan cara menimbang garam-garam makroelemen seperti yang tertera dalam Lampiran 1 dan satu persatu dilarutkan ke dalam 400 ml akuades sambil diaduk. Kemudian ditambah larutan mikroelemen, zat besi, vitamin, mio inositol, sukrosa, zat pengatur tumbuh yang diperlukan. Selanjutnya ditambah akuades sampai volume 900 ml, kemudian pH larutan disesuaikan menggunakan kertas pH menjadi 5,6 – 5,7 dengan menambah asam klorida 1N atau kalium hidroksida 1N dan ditambah akuades lagi sampai volume 1 liter. Ke dalam larutan tersebut ditambah agar-agar batang dan dipanaskan sambil diaduk sampai mendidih dan jernih, lalu dituang ke dalam botol-botol yang telah disterilkan. Setelah itu ditutup aluminium foil dan disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121° C, tekanan 1,2 atm selama 15 menit. Larutan mikronutrien dibuat dengan cara membuat larutan persediaan 250 ml untuk 50 kali konsentrasi. Caranya dengan menimbang dan melarutkan bahan-bahan mikronutrien yang konsentrasinya dikalikan 50 dan dilarutkan dalam 50 ml akuades, setelah bahan-bahan mikronutrien larut kemudian ditambahkan akuades lagi sampai volume 250 ml dan disimpan dalam lemari es. Untuk pembuatan 1 liter media digunakan 5 ml larutan persediaan mikronutrien.

Pembuatan larutan persediaan vitamin dilakukan dengan membuat larutan persediaan 200 ml untuk 50 kali konsentrasi. Vitamin yang diperlukan ditimbang dan konsentrasinya dikalikan 50 kemudian dilarutkan dengan akuades sampai volume 200 ml., kemudian larutan ini disimpan dalam lemari es. Untuk pembuatan 1 liter media diperlukan 4 ml larutan persediaan vitamin.

Pembuatan larutan persediaan zat besi ($\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dilakukan dengan menimbang 50 kali konsentrasi dan ditambah akuades 50 ml, lalu sedikit demi sedikit ditambahkan ke dalam larutan tersebut $\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang konsentrasinya juga 50 kali. Setelah zat besi larut larutan ditambah akuades lagi sampai volume 250 ml. Untuk pembuatan 1 liter media digunakan 5 ml larutan persediaan zat besi.

Parameter kecepatan pertumbuhan kalus dinyatakan sebagai harga Indeks Pertumbuhan (IP) dengan replikasi $n=15-20$, dimana harga IP dihitung sebagai

$$\text{IP} = (\text{berat akhir kalus}) / (\text{berat awal kalus})$$

B. Tahap 2 Ekstraksi dan isolasi alkaloid

Setiap sampel yang telah dikeringkan ditimbang ditumbuk halus dan diekstraksi dengan metanol pada suhu kamar dengan cara maserasi. Ekstraksi dihentikan bila ekstrak memberikan hasil negatif terhadap pereaksi Dragendorf dan Meyer. Pelarut metanol diuapkan pelarutnya dengan rotary evaporator tanpa pemanasan yang berlebihan, menghasilkan residu berwarna coklat. Ekstrak metanol diekstraksi dengan larutan asam sitrat 5% (pH 3-4), menghasilkan garam alkaloid, yang selanjutnya diekstraksi dengan kloroform untuk memisahkan lapisan asam (garam alkaloid) dan kloroform (non alkaloid). Larutan asam dibasakan dengan amonium hidroksida (pH 8-9), kemudian diekstraksi dengan kloroform. Alkaloid

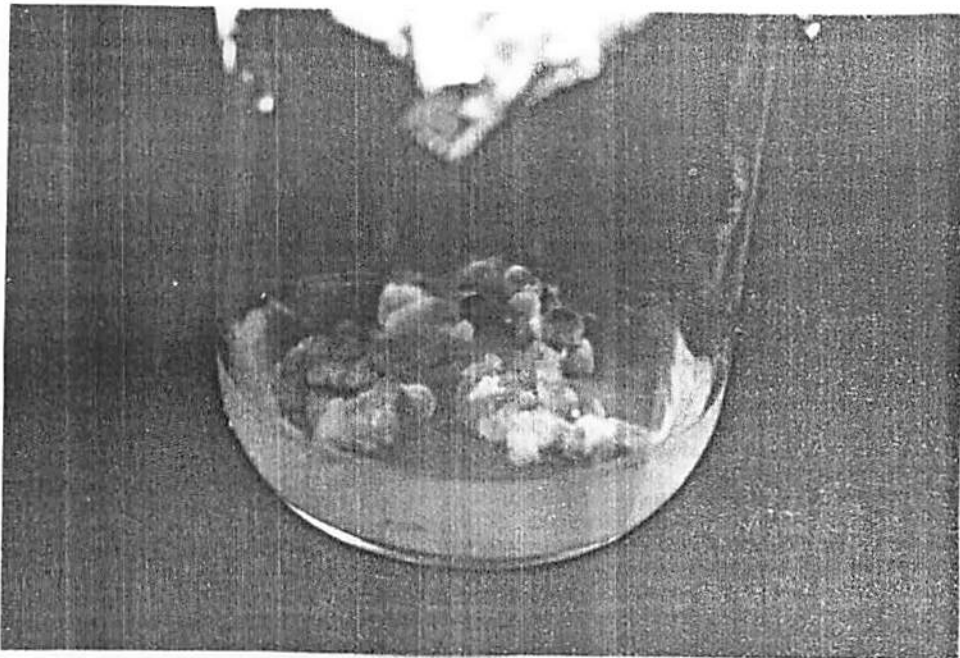
bebas dalam kloroform dicuci dengan air sampai pHnya netral. Larutan kloroform dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat selama 24 jam. Larutan kloroform diuapkan dengan rotary evaporator menghasilkan residu alkaloid total.

Untuk mengetahui ada/tidaknya alkaloid vinkristina dalam sampel digunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Masing-masing residu alkaloid total sampel dengan pembanding vinkristina ditotolkan pada lempeng silika gel dan dielusi menggunakan eluen kloroform : aseton : dietilamin (50:40:10). Hasilnya dilihat dengan penampak noda lampu uv pada panjang gelombang 254 nm dan pereaksi Dragendorf.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.)G.Don yang telah di sub kultur dari kultur stok pada salah satu perlakuan disajikan pada gambar 5.1. Disini hanya ditampilkan salah satu contoh dari beberapa perlakuan karena secara morfologi kalus dari berbagai perlakuan tidak menunjukkan perbedaan.



Gambar 5.1. Kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.) G.Don

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan kalus digunakan indeks pertumbuhan. Hasil perhitungan indeks pertumbuhan dan kadar alkaloid total kalus *C. roseus* pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.1.

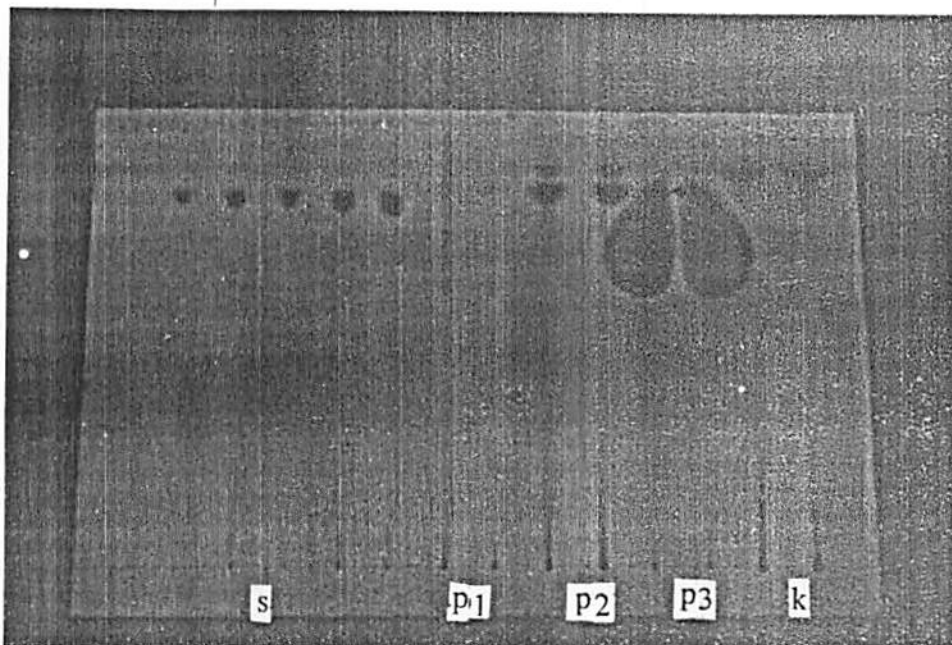
Tabel 5.1. Indeks pertumbuhan (IP), kadar alkaloid total dan hasil uji KLT vinkristina pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.) G.Don pada berbagai perlakuan

Kode kultur	Macam elisitor	IP(n=15)	Kadar alkaloid total (mg/g.kk)	Hasil uji KLT vinkristina
K	Tanpa elisitor	2,216 + 0,28	12,8	+
P1	<i>Pseudomonas sp.</i>	3,154 + 0,64	2,7	+
P2	<i>R. oligosporus</i>	2,405+0,91	8,7	+
P3	<i>Aspergillus niger</i>	1,322+0,54	290,1	-

Hasil analisis kualitatif kandungan vinkristina dalam kalus *C. roseus* menggunakan kromatografi lapis tipis disajikan pada gambar 5.2.

Dari hasil KLT (kromatografi lapis tipis) nampak bahwa dari ke empat perlakuan, tiga sampel terdeteksi bercak (noda) coklat tua yang identik dengan noda dari vinkristina standar dengan harga Rf yang sama yaitu 0,91, tetapi variasi intensitas dan luas noda berbeda.

Bila dibandingkan secara kualitatif dengan mengukur diameter noda pada KLT (gambar 5.2) didapatkan kadar vinkristina kalus *C.roseus* berturut-turut dari yang tertinggi adalah pada perlakuan dengan elisitor *R. oligosporus*, *Pseudomonas sp.* Sedangkan pada perlakuan dengan elisitor *A. niger* tidak terdeteksi adanya vinkristina.



Keterangan : s : standar (vinkristina); k: kontrol; p1 : elisitor *Pseudomonas sp.*;
p2 : elisitor *R. oligosporus*; p3 : *A. niger*

Gambar 5.2. Hasil analisis kualitatif vinkristina kalus *Catharanthus roseus* (L.) G.Don pada berbagai perlakuan dengan KLT (kromatografi lapis tipis)

Dari hasil KLT (kromatografi lapis tipis) nampak bahwa dari ke empat perlakuan, tiga sampel terdeteksi bercak (noda) coklat tua yang identik dengan noda dari vinkristina standar dengan harga Rf yang sama yaitu 0,91, tetapi variasi intensitas dan luas noda berbeda.

Bila dibandingkan secara kualitatif dengan mengukur diameter noda pada KLT (gambar 5.2) didapatkan kadar vinkristina kalus *C.roseus* berturut-turut dari yang

tertinggi adalah pada perlakuan dengan elisitor *R. oligosporus*, *Pseudomonas sp.* Sedangkan pada perlakuan dengan elisitor *A. niger* tidak terdeteksi adanya vinkristina.

Kadar vinkristina tertinggi diperoleh pada perlakuan *R. oligosporus* sebagai elisitor. Menurut Soegihardjo (1993) dalam mempelajari interaksi antara tumbuhan inang dan mikroba patogen harus diperhatikan pemilihan mikroba yang digunakan. Dari beberapa hasil penelitian diperoleh bahwa berbagai tipe jamur yang tidak bersifat patogen dapat digunakan sebagai elisitor. *R. oligosporus* merupakan jenis jamur yang tidak patogen, oleh karena itu diduga kalus *C. roseus* mampu merespon terbentuknya fitoaleksin yang pada akhirnya memacu terbentuknya metabolit sekunder yaitu alkaloid vinkristina.

Pada penggunaan *A. niger* sebagai elisitor tidak diperoleh vinkristina walaupun kadar alkaloid total pada perlakuan ini paling tinggi. Hal ini diduga karena *A. niger* merupakan jenis jamur yang patogen, maka respon tanaman untuk mempertahankan diri terhadap zat/senyawa yang bersifat toksik tidak dengan cara mengeluarkan vinkristina melainkan jenis alkaloid lain. Hal ini menarik untuk dilanjutkan karena jenis alkaloid yang ada pada *C. roseus* cukup banyak, sehingga perlu diidentifikasi jenis alkaloid yang merespon elisitor *A. niger* ini.

Selain tidak terbentuknya vinkristina, jenis elisitor *A. niger* juga menghambat pertumbuhan kalus. Hal ini dapat dilihat pada tabel 5.1 yang menunjukkan bahwa indeks pertumbuhan pada perlakuan dengan elisitor *A. niger* paling rendah. Menurut Eilert (1987) jenis jamur yang patogen terhadap tumbuhan justru akan menyerang sel tumbuhan, yang seharusnya terjadi pengimbasan terbentuknya fitoaleksin, namun

gagal dilakukan oleh sel tumbuhan tersebut. Akibatnya elisitasi yang diharapkan tidak berlangsung.

Pada hasil analisis kualitatif vinkristina kalus *C. roseus* dengan perlakuan elisitor *Pseudomonas sp.* didapatkan adanya vinkristina, walaupun intensitas nodanya lemah. Data ini juga didukung oleh kadar alkaloid yang rendah. Hal ini diduga senyawa yang dikeluarkan oleh *Pseudomonas sp.* kurang mampu menginduksi pembentukan fitoaleksin pada kalus *C. roseus*. Belum banyak penelitian yang menggunakan bakteri sebagai elisitor.

Senyawa antimikroba yang disintesis tumbuhan bila terinfeksi mikroba tertentu telah ditemukan sejak 1960. Senyawa tersebut mula-mula diperkirakan bertindak dengan cara serupa dengan antibodi hewan, tetapi senyawa itu tidak terlalu khas dalam melawan mikroba tertentu. Kelompok senyawa tersebut dinamakan sebagai fitoaleksin. Pada umumnya fitoaleksin jauh lebih beracun terhadap fungi daripada terhadap bakteri. Senyawa yang bertindak sebagai fitoaleksin antara lain berbagai gliseolin di akar kedelai, pisatin di polong kapri, faseolin di polong buncis, ipomeamaron di akar ubi jalar, orkinol di umbi anggrek, dan trifolirhizin di akar semanggi merah (Salisbury and Ross, 1992).

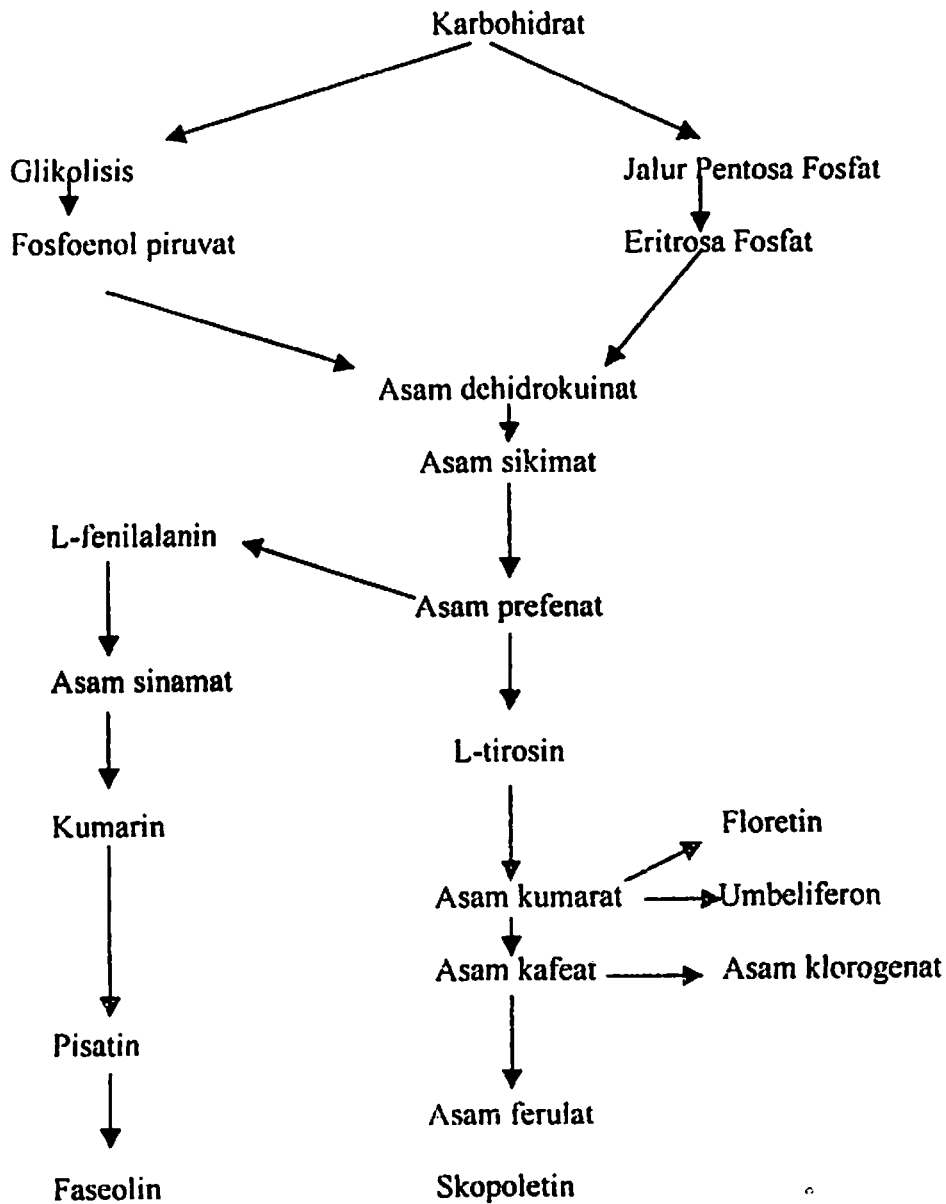
Lebih dari 150 fitoaleksin yang terdapat pada tumbuhan telah dicirikan, khususnya pada tumbuhan dikotil. Beberapa ditemukan pada monokotil atau gymnospermae, dan sejauh ini belum diketahui terdapat pada tumbuhan tak berpembuluh. Sebagian besar fitoaleksin adalah fenilpropanoid fenol yang merupakan produk dari lintasan asam sikimat, walaupun beberapa merupakan senyawa isoprenoid dan poliasetilen. Nampaknya fung non-patogenik sering menyebabkan toksisitas fitoaleksin meningkat dalam tumbuhan inang sehingga menghambat pertumbuhan

fungi. Sebaliknya, fungi patogenik merupakan parasit yang hanya berhasil meningkatkan kadar fitoaleksin yang tak beracun saja atau merombak fitoaleksin dengan cepat.

Senyawa yang menyebabkan diproduksi fitoaleksin disebut elisitor, walaupun elisitor juga mendorong tumbuhan untuk mengaktifkan reaksi pertahanan lainnya (Ebel, 1986; Boller, 1989). Beberapa elisitor merupakan polisakarida yang dihasilkan bila fungi atau bakteri patogenik menyerang dinding sel tumbuhan, sedangkan elisitor lainnya adalah polisakarida yang dihasilkan dari perombakan dinding sel fungi oleh enzim tumbuhan yang dikeluarkan oleh tumbuhan karena fungi itu.

Luka fisik tertentu dan sinar ultraviolet dapat menginduksi produksi fitoaleksin oleh tumbuhan. Suatu hal masih membingungkan tentang induksi oleh berbagai elisitor adalah bahwa fitoaleksin yang dihasilkan dari lintasan asam sikimat, demikian juga isoprenoid dari lintasan asam mevalonat, dapat terbentuk setelah penambahan satu elisitor. Belum ditemukan bagaimana lintasan metabolik yang sangat berbeda ini dapat diaktifkan oleh satu elisitor dan bagaimana elisitor yang berbeda dapat mengaktifkan satu lintasan tunggal. Diduga elisitor dikenal oleh protein tertentu di membran, yang kemudian memberi isyarat ke tumbuhan untuk memproduksi fitoaleksin. Sifat isyarat tersebut tidak diketahui, tapi dalam beberapa kejadian jelas bahwa isyarat itu meningkatkan transkripsi mRNA yang menyandi enzim yang mensintesis fitoaleksin (Templeton dan Lamb, 1988). Walaupun secara menyeluruh peranan fitoaleksin dalam resistensi penyakit masih diperdebatkan, sebagian besar ilmuwan sepakat bahwa ini merupakan salah satu dari berbagai mekanisme biokimia yang digunakan oleh tumbuhan untuk mencegah penyakit.

Sifat-sifat fitoaleksin adalah : (1) fitoaleksin adalah metabolit sekunder yang mempunyai berat molekul rendah, dihasilkan sebagai tanggapan terhadap kematian lokal sel tumbuhan, (2) sintesis fitoaleksin terjadi di dalam sel-sel sehat sebagai tanggapan terhadap bahan yang merembes dari sel mati, (3) sintesis fitoaleksin melibatkan banyak enzim. Biosintesis fitoaleksin, misalnya. Pisatin, kumarin, faseolin dan sebagainya. Biosintesis fitoaleksin dapat dilihat pada bagan berikut.



Senyawa fenol dihasilkan oleh tumbuhan lewat jalur asam sikimat dan asetat. Pada jalur asam sikimat, asam fosfoenol piruvat dari glikolisis bereaksi dengan eritrosa yang dihasilkan oleh jalur pentosa fosfat yang aktivitasnya meningkat pada tanaman sakit dan membentuk asam dehidrokuinat. Asam ini berubah menjadi asam sikimat melewati beberapa senyawa antara dari asam sikimat menjadi senyawa fenol.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Elisitor *Rhizopus oligosporus* dan *Pseudomonas sp.* mampu mempengaruhi pembentukan alkaloid vinkristina kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don
2. Elisitor *Aspergillus niger* tidak mampu mempengaruhi pembentukan alkaloid vinkristina kalus *C. roseus* (L.) G. Don
3. Berdasarkan luas noda hasil KLT, dari ke tiga macam elisitor (*R. oligosporus*, *Pseudomonas sp.*, *A. niger*) yang menginduksi alkaloid vinkristina paling banyak adalah *Rhizopus oligosporus*.

6.2. Saran

Dari hasil penelitian ini diperoleh bahwa pada pemberian elisitor *Aspergillus niger* didapatkan kadar alkaloid yang tinggi tetapi tidak dijumpai adanya alkaloid vinkristina. Hal ini perlu diteliti lebih lanjut untuk mengetahui apakah jenis alkaloid yang terdapat dalam kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don yang diberi elisitor *Aspergillus niger*.

Kadar alkaloid vinkristina pada kalus *C. roseus* sangat sedikit dibanding kadar alkaloid total sehingga sangat sulit diukur secara kuantitatif, oleh karena itu perlu dicari metode pengukuran secara kuantitatif yang sesuai sehingga dapat ditentukan kadar alkaloid vinkristina secara kuantitatif.

Perlu juga diteliti lebih lanjut, apa jenis fitoaleksin yang dihasilkan oleh *C. roseus* akibat adanya elisitor fungi maupun bakteri, supaya dapat diketahui biosintesis dari terbentuknya fitoaleksin tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1980. *Tanaman Obat*. Lembaga Biologi Nasional-LIPI. P.N. Balai Pustaka. Jakarta.
- Boller, T. 1989. Primary Signal and second messengers in the reaction of plants to pathogens, in W.F. Boss and D.J. Morre (eds.), *Second Messengers in Plant Growth and Development*. New York.
- Dodds, J. and Robertx, L.W. 1982. *Experiment in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. London.
- Dorieau, P., Merillon, J.M., Guillot, A., Rideau, M., Chenieux, J.C. and Brillard, M. 1987. Time Course Studies on Indole Alkaloid Accumulation and Changes in Tryptophan Decarboxylase and Strictosidin Synthase Activities : A Comparison in Three Strains of *Catharanthus roseus* Cells. *Planta Medica* : 53, 364-367.
- Ebel, J. 1989. Phytoalexin synthesis: The biochemical analysis of the induction process. *Annual Review of Phytopathology* 24: 235-264.
- Evans, W.C. 1989. *Trease and Evans Pharmacognocy*. Billiere Tindal. New York.
- Fujita, Y., Hara, Y., Morimoto, T. and Misawa, M. 1990. Semisynthetic of Vinblastine Involving Cell Culture of *Catharanthus roseus* and Chemical Reaction, *Progress in Plant Celluler and Molecular Biology*, dalam Nijkamp, H.J.J., van der Plass, L.H.W. and van Artrijk, J. (eds), Kluwer Academic Publisher. Dordrecht.

- Goodbody, A.E., Endo, T., Vukovic, J., Kutney, J.P., Choi, L.S.L. and Misawa, M. 1988. Enzymic Coupling of Cathranthine and Vindoline to form 3',4'-Anhydrovinblastine by Horseradish Peroxidase, *Planta Medica* : 54, 136-140.
- Gotlieb. 1990. Phytochemical Differentiation and Function. *Phytochemistry* : 29, 1715-1724.
- Hirata, K., M. Kobayashi, K. Miyamoto, T. Hoshi, M. Okazaki, and Y. Miura. 1989. Quantitative Determination of Vinblastine in Tissue Culture of *Catharanthus roseus* by Radioimmunoassay, *Planta Medica* : 55, 262-264.
- Holden, M.A. 1988. Elicitor of Cell Culture, *In* : Robeins, R.J., Rodes M.J. (eds) *Manipulating Secondary Metabolites in Culture*. Cambridge University Press.
- Manuhara, S.W.1994. *Kandungan Alkaloid Vinkristina Kalus Daun Catharanthus roseus* (L.) G. Don pada Berbagai Komposisi Media. Tesis. UGM. Yogyakarta.
- Miura, Y., K. Hirata, N. Kurana, K. Miyamoto, and K. Uchida, 1998. Formation of Vinblastine in Multiple Shoot Culture of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica* : 54, 18-20.
- Morris, P., 1986. Regulation of Product Synthesis in Cell Culture of *Catharanthus roseus* II. Comparison of Production Media. *Planta Medica* : 53, 121-126.
- Petiard, V., 1980. Antimitotic Activities of *Catharanthus roseus* Tissue Culture. *J. Nat. Prod. As Med. Agents*, 447-469.
- Rokem, J.S., B. Tal, and I. Goldberg, 1985. Methods Increasing Diosgenin Production by *Dioscorea deltoidea* Cell in Suspension Culture. *J. Nat. Prod.* : 48, 210-222.

- Sato and Yamada Y., 1984. Selection of Cell Lines for High Yields of Secondary Metabolites, *In* : I.K. Vasil (ed). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press. London.
- Samson, R.A., Hoctstra, E.S. and van Oorschot, C.A.N. 1981. Introduction to Food-Borne Fungi. Cetraalbureau voor Schimmelcultures. Netherlands.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company. California.
- Schubel, H., Ruyter, C..M. and Stockigt, J. 1989. Improved Production of Raucaffricine by Cultivated Rauwolfia Cells. *Phytochemistry* : 28, 491-194.
- Soegihardjo, C.J., 1993. *Bioteknologi Kultur Jaringan Tanaman III*. Program Pascasarjana UGM. Yogyakarta.
- Stone, B.A. 1989. Cell walls in plant-microorganism associations. *Australian Journal of Plant Physiology* 16:5-17.
- Torzell, K.B.G. 1983. *Natural Product Chemistry*. John Wiley and Sons Limited. New York.
- Tjitrosoepomo, G. 1979. *Taksonomi Tumbuhan (Taksonomi Khusus)*. Penerbit Bhratara. Yogyakarta.
- Van Steenis, C.G.G.J., 1975. *Flora untuk Sekolah di Indonesia*. PT. Pradnya Paramita. Jakarta.
- Verpoorte, R., R. van der Heijden, J. Schripsema, 1993. Plant Cell Biotechnology for the Production of Alkaloids : Present Status and Prospect. *J. of Nat. Prod.*: 56, 186-207.

Wijayakusuma, H.M.H., A.S. Wirian, T. Yaputra, S. Dalimartha, B.Wibowo, 1994.

Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia Jilid I. Pustaka Kartini. Jakarta.

Lampiran 1. Komposisi Media Murashige and Skoog

A. Makronutrien	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
B. Zat besi	
Na ₂ EDTA	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
C. Mikronutrien	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KJ	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,25
D. Vitamin	
Asam nikotinat	0,5
Piridoksin HCl	0,5
Tiamin HCl	0,1
Glisin	2,0
E. Zat Organik	
Mio Inositol	100
Sukrosa	40.000
Agar	8.000
pH	5,7-5,8

1 SEP 2003

PAMERAN

2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025

